

PATERT ARRESPRACES OF TAPAN

(11) Publication number :

62-259597 = CA 108: 1561210

(43) Date of publication of application: 11.11.1987

(bl) Fot.CI. C12P 21/02

PROPERTY AND A SECOND CONTRACTOR OF THE PROPERTY AND ADDRESS OF THE PROPERTY ADDRESS O (21) Application number: 61-104319 (71) Applicant : AJINOMOTO CO INC

(22) Date of filing : 07.05.1986 (72) Inventor : HONDA YUTAKA TSUCHIYA TOYORITO

TAREMOTO TADASHI YUGAWA TOSHIHIDE

(54) ENZYMIC SYNTHESIS OF N-PROTECTED PEPTIDE

(57) Abstract:

FURPOSE: To efficiently obtain the fittled compound, by reacting an R-protested amino soid with an amino acid in an aqueous layer in a two-phase system resction medium of an organic solvent containing a quaternery assentum selt. etc., and water using a preseclytic encyme and migrating the resultant product to an organic solvent phase.

CONSTITUTION: An N-protected amino soid, e.g. N-acetyl-1-aspartic soid, etc., or a derivative thereof is reacted with an amino acid, e.g., L-phenylalanine, etc., or a derivative thereof in an aqueous layer in a two-phase system reaction medium of a water-immiscible organic selvent containing a dissolved quaternary ammonium salt, e.g. trioctylmethylammonium chloride, etc., or quaternary phosphonium salt and water using a proteolytic enzyme to form an Nprotected partics containing one or more carboxyl groups. The resultant Nprotected pertide is then converted into a lipophilic queternary ammonium sait or phosphonium salt and migrated to the organic solvent phase to afford the aimed compound.

LEGAL STATUS

(Date of request for examination)

(Date of sending the examiner's

decision of rejection!

|Kind of finel disposel of application

other than the examiner's decision of

rejection or application converted replacration)

IDate of final disposal for abolication?

[Patent number]

(Date of registration)

(Number of appeal against examiner's uscision of rejection?

Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

(Date of extinction of right)

Copyright (C); 1998, 2003 Capan Patent Office

@ 日本園特許庁(JP)

命特許出額公開

® 公開特許公報(A) 昭62-259597

@Int_Cl_*
C 12 P 21/02

識別記号 庁内整理番号 6712-4B ◎公開 昭和62年(1987)11月11日

審査請求 未請求 発明の数 2 (全8頁)

⊗発明の名称 Nー保護ペプチドの酵素的合成法

の特 関 昭61-104319

の出 類 解61(1986)5月7日

川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内 60条 明 著 本 裕 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内 の発 明 者 土 屋 费 人 太 F 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内 砂発 明 者 沙猫 明 者 JH 30 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の業株式会社中央研究所内 東京都中央区京橋1丁目5番8号 味の素株式会社 **允出 額 人**

\$15 ATC \$2

1. 現頃の名称 N 、保軽ペプテンの概素的合成法

辨素的分成法。

2. 特許額束の範囲

(I) N - 保護すぎノ灌またはその誘導体とアミノ産またはその誘導体とを、 4 級 アンモニの 10 地震 ない 10 大大 2 地域 10 大大 2 地域 10 大大 2 地域 10 地域 10

 N - 優離ペテテドまたはその誘導体の対象的合成 to

3.张明の解釋女報問

本発明は、ドー保護 イブナドの貯款的合成法に 関し、更に詳しくは少なくとも1つのカルメキシ ル基をもつドー保護 イブナドの 緊集的合成法に関 する。

近年、マグナド会成において、耐楽を用いる方法がマラく化を超こまないという理由から注目を集め、初々のペプナド合成への利用が収められて、こので、この方法では解析としてが自分解析案を用いるみ、漁列、一旦性収したイプテドの加水分解反応を伴う。因みに、この流自分解析業を用いる反応は、別組の如く、ア便反応でもさか。 対して、マグナド語の生成因こを分解するである。 入海には加水分解反応をは、別組のなど、ア便反応でもさい、マグナド語の生成因この影響でよぞイントである。 大変には、生成成也を比較させて反応素外に能力が表して、水グスに成び、生成成也を比較では、生成成也を対して、水色液体化液が、水色液体をがない。生成2000を有機関係を始出

(2)

して反応系外に除く方法が主として用いられている。しかし、これらの方法では、通常の際皮にの生かみ高を持つものなどでは、通常の態度反応の生作の下では水に対する密解度が高い為、危険もせず、有様所護環にも抽出されず、反応は効率として変水性の高いホルミル点(以下 14 を連記する。)を用いた場合は特に顕著である。ところで距白分解の選定はエンド型とエキン型があるが、エモいた場合には、アミノ流のの原文ではエンド型とエキン型があるが、エモいた場合には、アミノ流気の高質として下さり伸を使用するので、生成物のペプチドのカルセキンル来渡は近畿のカルマキンとあるより、正に上配の例に

せこむ本税明省らは、N - 保護したアミノ原志 るいはその希導体とアミノ原志るいはその務場な を減自外解構業を用いて反応させ、少々くとも1 つのカルヤキシル基を有するN - 保護ペアテリを 効果よく今級する方法につき級意検前した結果、 (4)

方法では8-保護-よ-し-アスパルテル・し-フェニルブウニンが制能することや、実会性の馬 い酢機を使用することなど、実れた方法とは買い がたい。本類明方法を適用すれば、上町欠点を充

が取れておおうることなど、使れた方法とは言いがたい。本籍別方法を適用すれば、上記欠点を寛原し、N - 保護 - ロ - APのみを効率よ(合成することができる。

※教訓とデナトルは、本知明末次を思いまし

実施学に、本発明方法を用いると、本中にかける解析区とに、生成するN - 保護 がけっています。 東京 では、N - では、 保護 が アナウトの収率が大幅に向上する。例えでは、 保護 が アナウトの収率が、 10 で、 10

期くべきととに、木餅素反応を有機得強と水との 2 相率反応数体中で4 級アンモニウム塩あるいは 4 根ホスホニウム塩の存在下に行なうたとにより、 本業有機相能には終行しない他成婚を製造性の 4 切アンモニウム塩あるいば4 般ホスホニウム塩 として、有機能薬器に移行させ、ペプチド生成反 応を効率よく進行させ得る事を見出し、本発明を 致能させるに置った。

本発明方法は、近年、受れた世轮剤として任日されているアスペルテーム(α - L - アスペルルルル・L - アスペルテーム(α - L - アスペルルルル・L - アスペルテル・L - アスペルテル・L - アスペルテル・L - アスペルテーム・N - 保護 - α - レーアスペルナル・L - アスペルテームに実施した。例の会既に避用すれば等に 数力を影響する。即ち、N - 保護 - α - ムルの製造としては アスペルテームに実施 - α - ムルの製造としては 世一、N - 保護 - L - アスペラヤン製剤水物とし - アェニルアラニンを耐寒中で反応させる力法がしられている(等全間 6 5 - 26 18 3) が、この(4)

水器明为治化よる上。 解 1 化 2 和 若 度 低 群 体 4 用いてN-保護ペプチド合成反応を行ない、生成 したN・保護ペプチドを適効性の4級アンモニッ ム塩あるいは4般ホスポニウム塩として有機溶媒 類に移行すせるととによりペプティ生成反応を効 率よく進行させ得るが、また、 截2 にガー保護す ミノ酸あるいはその幾準体とアミノ酸あるいはそ の誘導体とを水中で厳命分解除案を用いて反応す せた後、有機器態とも騒アンモニウム塩もるいは 4級ホスホニウム塩を添加し、生成したドー保護 ペプチャと厳料のN-保護すくノ歌あるいはその 酸薬体とアミノ酸あるいはその終海体の有機整体 /水の分配係数の※を利用して生成したN-保護 ペプチドを有機整模版的出するととも出来る。 :有機附盤器と水器とを分離した後、第1の方法 により、水路に再渡、4級アンモニウム治あるい はる最本スポニウム塩を含む有機器器を加えて2 瘤系反応核体中でペプチド生成反応を行るい、と れを練載して行るをは、ペプチド生放反応を効率 よく兼行させるととが出来るのはいりまでもない。 もちろん、雑2の方法によってペプチド生放反応 を検送し行なってもよい。

N - 保護アミノ酸生たはその粉等体と反応させるアミノ酸またはその粉等体のうち、最後者のア ミノ酸粉準体としては、鍔えば、L-フェエルア

(7)

新娘、アタノール、アミルアルロールのどときアルコール側、メテルエテルケトンのごときケトン 製、タエチルエーテル、 ツイソアロピルエーテル のごときエーテル脚などが代表的なものであり、 これらのうちの任意の2 増加し上からなる性合称 鍵を使用するととも出来る。

水場明の方浜にかいてもちいられる酵素とし、 既 状況自分解除業であれば停化制度はない。 又、 最 反応を行なり線の反応衆の同は使用する酵素の は械により異なり、例えば、プロテアーせ材(野鰯薬技製)及びメリエンターせ5人(メリエン メル部電社製)の場合は3~7で、アキアーセ く 大物化液柱制)の場合は3~7で、アキアーゼ の防実反応性額度10~90で、需素筋性を解存 する観点からは20~50でで行立りとよい。

本務明の方法にかいて、両也発物質の使用機能 には時に制確はないが、ペプサド単級反応をより 効率よく過行させるためには、高い力が顕立からは、 ペプテド生成反応を進行させるという観点からは、 出発物質の測度が重要であって、同者の使用比率 ラニンメチルエステルがある。

なか、N・保護アミノ俊生先はその誘導体とも れた反応させるアミノ微生たはその誘導体との組 等体が少くとも1つの変観のカルポャンル基をも つもので支ければならない。とれば、前頭のよう に、北蔵したドー保護ペプナドまたはその誘導体 を有機構成に振所している4様アンギェウム塩生 たは4般ホスホニウム塩のカアオン認分と前台さ せて新たに以・保護ペプナドまたはその誘導体の 顕衡性の4級アンペニウム塩または4級ホスホニ 単の4版とするためである。

又、有機解擬としては、4級アンモニウム塩主 たは4級ホスホニウム塩を腐廃し得てかつ次と物 ーに置和しないもので出現物質及び目的性疾物を がに然性なものでなければ、いかなる唇葉も物形 するととが出来る。トルエン、キシレン、ヘキサ ンのごとも提化水素類、酢酸エテル、酢酸プテル のごともまステル類、タロロホルム、腐塩化炭炭 エテレンジクロライドのごときへのゲン化液化水 (61)

には毎に制限はない。

有様都護層に第4級アンモニウム塩または小ス ホェウム塩の形で努行したパー保険ペプテンさた せその粉増体を分離回収するには、例えば、次の ようにするとよい。4級アンモニウム塩またはホ スホニラム塩の形になったパー保護ペプテドまた はその砂棒は初えば大坂塩水等と残合することに より遊離をせることができる。するわら、外在 なる機能減増から食塩水で抽用すればよい。食塩 水の鍋皮は2~20(直盤) あがよい。

以下、実施的、比較例により、本発明をさらに 説明する。

災滌例1

N - アセケル - レーアスペラヤン酸 (以下、Ac-Aso と前記する。) 0.5 4 x (3.1 mms2)とし - フェニルアラニン (以下、Phn と締犯する。) 0.1 x (0.6 mms4)を通量の水圧器折し、水酸化ナトリウム水解器を加えて声も5 mcでした。この水器装圧プロケアーせい (又野製業社製) 5 0 mを添加した。完全化解するせた弦、トリオラケルアンキニウムタロリド (Aliquan 3 3 6) 1.2 5 x (3.1 mms4) ロトルエン解解 1 0 mt を加え、4 0 でで 2 4 時間最 した。

皮充策中(水湯及びトルエン湯)の Ao - α - AP を流遊策体タロマトグラフィー(以下、 HPLUと時 記する。) にて逆蓋したところ、 Pho に対して 4.2 手の収率で生成していた(水湿1.2 き。トル エン陽3.0 き)。

(11)

s (3.1 mmod) のクロロホルム溶液 1 8 28 を加え、4 8 2 で 2 4 時間 経触した。

版応報中(水桶及びタロロホルム制)の Ae-α-AP な、HPLC にて設益したところ、Phs に対して 4.2 章の収率で生成していた(水圏 1.2 章。タロ ロホルム圏 3.0 章)。

製施例 4

As-Asp 0.5 4 g (3.1 rens2)とPbs 0.1 g (0.6 mns2)を譲渡の状に削削し、水体化ナトリウム水 削強を加えて利4.5 に胸盤した核、全体を5 ndに した。この水解板にプロッナーサ州 (天野製業社 製)50 写を折加した。先全に指削させた後、テ トラコープテルポスポニウムプロマイド1.0 5 g (3.1 mns2)01.2 - ジクロルエメン解放10 nd を加え、40 Uでよく即削低機した。

反応減中(水榴及び1、2 - ジタロルエタン編) のA- - α- AF を、FFLににて定動したところ、Pha に対して3 1 5 の数率で生成していた(水海1.6 5 , 1 、2 - ジタロルエタン編1.5 る)。 比較例1 (実施例1 ~ 5 に刻する比較例)

(13)

突 施 倒 2

Ac-Asp0.5 4 x (3.1 mmod)とPbo 0.1 x (0.6 mmod)と連載の水に溶解し、水酸化ナトリウム水 溶液を加えてjid.5 に誤撃した後、全体を5 adにした。との水循原にプロテフーせば(天野服祭社 リカットの水循原にプロテフーせば(天野服祭社 数)50 9を添加した。完全に溶解させた後、トリオタテルノナルアンモニタムタロリド(Allegatt 33 6)1,25 x (3.1 mmod)の四進化炭素溶度 10 mfを加え、40 0で2 4 時間溶過した。

反応療中(水層及び限線化炭素線)の Ae-α-AP を、 BPLC 化定量したところ、 Pho に対して4、3 のの事で生成していた(水降1、1 多、四塩化炭 素層3、2 多)。

解 绘 例 3

As-Asp 0.54 g (3.1 mmeのとPho 0.1 g (0.6 mmol) を過量の水に溶解し、水酸化ナトリウム水溶解を加えて対 4.5 に調整した後、企作を5 xxi に した。との水溶液にプロテワーサが(更野製薬社製)5 0 甲を成功した。完全に溶解させた後、セナルジメナルペンジルアンモニウムタコリド123

(12)

As-Asp 0.54 g(3.1 mmod)とPho 0.1 g(0.d mmod)を適識の水に将郷し、水便化ナトリウム水 常液を加えて呼4.5 に納難し大後、金体を5 zd化 した。との水溶液にプロテアーゼは(天野製薬社 利)50 等を頻加した。完全に解解させた後、40 Cで24 時間接換した。

水積中の Ae-α-AP を HPLC 化て定量したところ、 Pho に対して 1.6 多の収率で独成していた。

斑片例 5

Ac-Acp 2.17 x(124 mmoL)とPho 0.1 x(0.6 mmoL)を適量の次に溶解し、次確化ナトリウム水 確接を加えて遅4.5 に調整した後、余体を5 型にした。この水器液にグロナアーせ続(天野 類離社 契)5 の 9 を 添加した。完全 化溶解させた後、トリオラナルメナルアンセニタムタロリド (Alique) 33 6) 1,25 x(3.1 mmoL)のトルエン器液10 Mを 7m え、40 でで44 時間強強化

投店兼中(水陽及びトルエン陽)のAo - α-AP を、HPLC化で定量したところ、Pbs に対して11.1 多の収率で生成していた(水陽 3.3 を、トルエン

(14)

89 7 8 %) .

安務例 8

As-Asp 2.1 7 s (1 2.4 mme2)とPho. 0.1 g(0.6 mme2) と液理の次に結構し、水酸化ナトリウム水 物液を加えて耐く5 に調整した後、全体を 3 at に した、この式樹脂にプロケブーせが(天野製織社 剝 3 5 0 知を指加した。完全に耐解させた後、ト リオタヤルメチルアンモニウムタロリア(Aliquat 3 3 6) 1.2 5 g (3.1 mme2)のトルエン/へや サン (1/1) 耐酸 1 0 ml を 加え、4 0 0 で 4 4 時 間 短離した。

反応策中(太澄及びトルエン/ハキサン層)の Ac- at - AP を、 IPIC にて定量したととる。 Pho に 対して 1 1.0 多の収率で地或していた (水層 3.1 ま、トルエン/ハキサン署 7.9 ま)。

外 納 例 7

As-Asp 2.17g(12.4 mms2)とphs 0.1g(0.6 mms2)を消費の水に有解し、水酸化ナトリウム水 耐酸を加えて川4.8 に綿壁した酸、全体を5 m が した。この水積液にブロテフーサM (天野製業社 (15)

加北で川4.5 に前壁した後、金がを 5 ml にした。 この太陽液にプロテフーせが(実別製鉄 観) 200 町を添加した。完全に簡素させた後、トリオクチルメナルアンモニウムタコリド(Aliquet 336) 1.25 x (3.1 mac) のトルエン路は 10mlを加え、40℃で48世間解離した。

W ME EM 9

An-Asp 0.5.4 x (3.1 pmoc) とPhe 0.1 x (0.6 pmoc) を適量の水に物解し、水像化ナトリタム水が数を加えて対3.0 に調整した後、全体を5.4 にした。この水溶液にプロテフードが(天野製薬比較)5.0 場を確加した。完全に解解させた後、トリナクチルメチルアンモニウムタロリア (Aliquat 3.3 a) 1.2 5 x (3.1 pmoc) ロトルエン将装1.0 Mを加え、4.0 でで2.2 時間接後した。

(17)

到)50 時を節加した。完全状溶解させた後、セナルプメチルペンプルアンモニリムタロリド246 ま(5.2 mmoと)のタロロホルム控鎖20 ㎡を加え、 40 ℃で44 時間報費した。

双筋板中(水路及びクロロホルム(種)の1Ae-α-APを、NPLCKで発性したところ、PAs 以列して 2.6.1 単の収率で出版していた(水道5.1 年。クロロホルム間15.0 番)。

比較例2(提施例5~7に対する比較例)

Ac-Asp 2.17 g (12.4 mme4)とPha fi.1 g (0.6 mme4) と確全の水に粉解し、水酸化ナトリウム水 が酸を加えて対4.5 に関盤した後、金像を 5 ndにした。との水解被にプロテフーせが(欠對製薬 社 割) 5 0 場を接加した。完全に推携させた後、40 でで44時間折磨した。

水銀中の At-α-AP を MPLC 化て定貨したところ、 Pho に対して 5.2 まの収率で独成していた。

平 热 何 3

Ae-Aep 9.5 4 s (3.1 mms L) と Phe 0.1 g (1.6 mms L) を適量の水に耐解し、水漿化ナトリウム次解複合 (16)

を、HPLCがて饱量したところ、中ho に対してふる 多の収率で生成していた(水浴の8多、トルエン 浴258)。

災路例10

Ar-Asp 0.54 g (31 mmol) と Pho 0.1 g (0 6 mmol) を適能の水に溶析し、水理化サトリウス水料度 た加えて利45 に対感した後、金体を5 mirc した。 との水溶解に マッケーせ M (支頭没染社別) 5 0 号を絵加した。 完全に解析すせた後、トリオタテルノナルアンモコクムタロリド (Aliquei 3 3 6) 1.2 5 g (3.1 mmol) のトルエン相度 10 彩を加え、 25 でで 9 4 時間 報像した。

仮応報申(水階及びトルエン海)のAe・ベルト を、 PRLC にて発費したとなる。 Phe に対して 4.0 まの取事で生成していた (水海 1.2 ぎ、トゥエン 湯を書う)。

班 施 例 ! !

N-ホルミルーL-アスパラヤン酸 (以下、 For-Asp と解記する。) 0.5 g (3.1 mmol)と Pho 0.1 g (0.6 mmol)を適位の水化が新し、水

(18)

版化ナトリのム水解放を加えて向4.5 に調整した 仮、全体を 5 叫にした。この水解液にプロケフェ では(沢野瀬東社族) 5 の 砂を輸加した。 形別された後、トリオクナルメナルアンセニウム クロリド (Aliquat 3 3 5) 1.2 5 g (3.1 med) のトルエン部該10 加を加え、40 セで7 2 時間 域能した。

反応数率(水温及びトルエン線)のN・ホルミ ル・ユーレ・アネベルチル・レ・フェベルアラユ (以下、Fet-ロールと暗記する。)をFPLCKで 定量したところ、Phe に対してより手の収率で佐 成していた(水場の7号、トルエン層22号)。

比较明3(更购例11代对する比較例)

水液中の Fat - ローAP を HPLC にて定量したところ、 (19)

ンタル即母社制) 50 写を添加した。完全化解解 させた後、トリオクテルメテルアンモュウムタロ リド (Aliquat 3 3 6) 1.2 5 g (3.1 mmo c) の 酢便エテル器数 10 M を加え、4 0 C で 7 1 時間 頻慢した。

炎応原中(水層及び酢酸エチル線)のPez-a-AP をHPMにに定量したところ、Phe に対して1.1 s の収率で生成していた(水隙0.3 s , 酢酸エチル 個0.8 s)。

比較例 4 (契務例 1 3 IC 対する比較例) Per-Asp $0.5 \pm (6.3 \text{ I amod })$ \geq Pho $0.1 \pm (0.6 \text{ mase })$ \geq Pho $0.1 \pm (0.6 \text{ mase })$ \geq 温量の水に豚解し、水飲化ナトリッ人水酸 放を加えて川 4.5 K (in) \geq C \leq C

実施的14 日、ホルミル・L・アスパラギン第・α・メチ Pho に対して 0.8 % の収集で生成していた。 審 権 例 1.2

For-Asp 2.0 g (1.2.4 mass.)と Phs. ©.1 g (0.6 mass.)を消費の米に 前所し、水酸化ナトリウ 土 布部版を加えて PH、5 に調整した た、全体を5 耐化した。この水衡線にグロテアー セリ (尺野 財政社員) 3 0 即を 配列した。 元 全 に 部所 させた 休、トリ メクテルノテル アンエルウ ムタ ロリド (Aliquei 3 3 6) 1.2 5 g (3.1 mass.)のトルエン 部版 1 0 叫を加え、4 0 じで 7 6 時間 組織し

仮応収中(水階及びトルエン場)の For- a- AP を HPLC にて起鉄したとと 5、 Pho に対して 6.3 を の収率で生成していた (水陽 2.0 す , トルエン領 4.3 考)。

淋粒倒 1 3

Por-Asp 0.5 & (3.1 mmod)とPhe 0.1 g (0.8 mmod) と混乱の水に朝鮮し、水陰化ナトリウム水 器被を加えて対 4.5 に関盤した後、全体を 5 nd に した。この水器液はイリエンター せ 5 A (オリエ (20)

ルエステル(以下、Per-May-CM6と転割する。) 0.5 4 g (3.1 mmol)とPie 0.1 g (0.6 mmol) を適益の水に解派し、水原化ナトリウム系輸液を 加えて川4.5 に開墾した後、全体を5 がにした。 との水解板にプロサフーせが(天野製薬社会) 5 の町を添加した。死全に鬱奪させた後、トリコ タナルメテルアンモニウムクロリド (Aliquat 3 3 6) 1.2 5 g (3.1 mmol)のトルエン解剤 1 0 mを軟化、水陽及KFトルエン解)のアルコーAP 及防液中(水陽及KFトルエン解)のアルーAP

を HPLC にて定量したところ、 Pho に対して 7.2 まの 収率で生成していた (水澤 1.8 ま , トルエン 急 5.3 ま)。

比較例5 (実施残14に対する比較例)

Fer-Asp-OMs 0.54 g (3.1 mmoc)とPho 0.1 g (0.6 mmoc)と変適量の水に部部し、水硬化ナト リケム素器変を加えて河4.5 に誘動した、全体 を3 Mにした。との水部隙にプロテフーサM (天 野製薬社製)5.0 叫を部加した。完全に前所させ 大後、4.0 TC 6.5 時間 地上た。

(22)

水敷中の Por - a - AP を HPLC にて定量したとと ろ、 Pho に対して 2.1 その収率で生成していた。

N - サンダルボキシカルポニル - L - アメバラヤン館 (以下、 2-1.4mg と間配する。) 0.8 3 g (3.1 mms 4) と Pb t 0.1 g (0.6 mms 4) を連載の水に前折し、水酸化ナトリウム水溶液を加えて出る5 K 開墾した後、全体を5 mkにした。 C の水溶液にプロケアーゼは (天野到職社別) 5 0 9 を添加した。 完全に溶解された後、トリオラナルメチルアンモニウムクロリア (Atiquet 3 3 6) 1.25 g (3.1 mms 4) のトルエン群放 1 0 mlを加減した。

反応等中(水瀬及びトルエン湖)のドーペング ルオセンカルポニルーは-し-アスペルテル-し -アュベルアラニン(以下、モーローAPと場配す る。)を fPLC にで設量したところ、Pho に刻して 思1まの収率で生成していた(水道11ま・トル エン増入0ま)。

比較例6(埃施例15 K对する比較例)

ルオキシカルボニルー α、L ーフェニルアラニン メナルエステル(以下、Z - α、APM と略記する。) を HPLD にて定量したところ、Pbs に対して S 4.6 のの原軍で生成していた(水屋 1 8.0 %。) トルエン節 3 6.6 %).

比較例7(與施例16に対する比較例)

でAsp. 0.67 g(2.5 mmc)とP M O.45 g (2.5 mmc4)を溜載の水に部料し、水酸化ナトリ ウム水溶板を加えて消る2 に開新した後、全体を 1 8 延忙した。この水溶液にサモアーゼ(大和化 放吐製)1 2 0 吻を節加した。完全に部解るせた 後、4.0でで3時間線量した。

水酸中の Z - α - APM を B P L C 化て定量したと とろ、 Pho に 対して 1 9.4 手の 収率で生成してい た。

銀 独 和 1 7

N・アセナル・L - アラニン (以下、Ac-ACA と助記する。) 0.4 g (3.0 mmos2) とし、ロイン ン(以下、Leu と助配する。0.0 B g (0.6 mmos2) を適量の水化樹餅し、木酸化ナトリウム水精酸 (25) 2~4sp 0.83 g (3.1 mmse2)と Pbs 0.1 g (0.6 mmse2) を適覆の水に前列し、水便化ナトリウム水 解釈を加えて向えるに同数した後、全体を5 miにした。この水管板にプロテフーセ列(天野製薬社列)5 の甲を設加した。 完全に跨路させた後、40 です4 4 脚間 細した。

エーAsp 0.67 g (25 mm d)とLーフェニルフ フニンメサルエスアル (以下、FM と時間する。) 45 g (25 mm e)を通彙の水に解析し、水敏 化ナトリウム水解原を加えて同る。2に附近した様 大体を18 stにした。この水解版にアモアーポ 大神化設社別)120 mを振加した。光合化解 解言せた軽、トリオクテルメサルアンモニのムタ ロリド (Alignot 336)2.06 g (5.1 mm e2) のトルエン溶散20 がを加え、40 で 3 時間報 動した。

反応核中 (水陽及びトルエン器)のN-ペンジ (24)

を加えて同4.5に割数した私、企体を5.0 m(にした。この水部 版にプロテアーセが(天野製 解社 数) 5.0 写を添加した。完全水路 解させた 枚、トリオータチルメテルアンモニウムタロリド(Aliquat 33 8) 1.2 2 g (3.0 mma 6) のトルエン路 群 1.0 配を加え、4.0 で4.9 時間 組造した。

及応報中(水形及びトルエン層)のAc-Aid-Leu を HPLC にて処理したととろ、Leu に対して 2.3 の収率で生成していた(水増 0.6 多, トルエン 粉 1.7 4).

比較例8(異態例17花別する比較例)

As-Als O.4 e (3.0 mmsc)と Leu O.0 Rg (0.6 mmsc)を適当の水に前額し、水酸化ナトリクム水 転載を加えて計4.5 に関盤した後、全体を5 stir. した。この水衡板にプロケフーせが(沢野製業社 数)3.0 町を扱加した。完全に解析させた後、40 です49時間振動した。

水敷中の Av-Ala-Les を APLCにて定盤したとこ る、 Lea 化対して 8.7 多の収率で依放していた。 実施側:8

(28)

比較到3と同様に反応させて持ちれたPer-Asp 2.5 g , Per-a-A-AP 0.5 g を言む時次反応費2 5 miにトリコクテルノ ナルアンセニウムクロリドル25 g のトルエン桁 乗50 miを加え、所を成りに調整した後、2 7 ℃ で15 分配を加速した。

トルエン爆を分離し、Por-Aup、Por-α-AP 及びL - PosをHPLC だて定量したとこう、トル エン場中に下ゥーα-APL 76 多前間もたいた。 一方、Por-Aup、Pos は、それぞれ、9 s . 7 s 相 出されたにすぎなかった。因みに、Por-α-AP、 Por-Aup 及び Pos の ス・トル エン間の分配係数は、 それぞれ、135,004,003であった。

比較例 9 (実施例 1 8 に対する比較例)

トリオクテルノテルアンモニウムクロリドを経加しない以外は、実施例18と同様の実施を行を ったところ、For-α-APはトルエン海中に全く油 出されず、その分配係数は0でもった。

突纳约10

比較例1 と間機に反応して得られた Ac-Asp 2.6g,

(27)

り リオクテルメテルアンモニウムクロリドを頭加しない以外は、実施別19と同様の実験を行なったととろ、Ac-α-APはトルニン層中に全く抽出されず、その分配法数は0であった。

特許出線人 张 四 弟 株 式 会 社

(28)